

# **SVILUPPO DI PRODOTTI COSMETICI ANTI-AGEING CONTENENTI IDROSSITIROSOLO**

<sup>a</sup>P. Perugini, <sup>a</sup>M. Vettor, <sup>b</sup>A. Merendino, <sup>b</sup>L. Villanova, <sup>a</sup>I. Genta, <sup>a</sup>B. Conti, <sup>a</sup>F. Pavanetto

La prevenzione dell'invecchiamento cutaneo è uno dei più attuali ed interessanti temi di ricerca della moderna cosmetologia. Al processo fisiologico di invecchiamento si sovrappone un invecchiamento precoce causato da fattori estrinseci, quali radiazioni UV ed inquinanti, che si manifesta con danni al tessuto connettivo provocati principalmente da reazioni di tipo ossidativo. L'uso di antiossidanti è, quindi, un'importante strategia nella prevenzione e nel trattamento dei danni fotoindotti. Particolare attenzione è attualmente dedicata agli antiossidanti naturali, tra i quali composti fenolici come l'oleuropeina, il tirosolo e soprattutto l'idrossitirosolo. Queste sostanze possono essere estratte dall'Olea Europea, ma l'estrazione risulta complicata dalla loro sensibilità all'ossidazione e all'idrolisi.

Lo scopo del lavoro è stato lo sviluppo di un prodotto cosmetico sicuro ed efficace nella prevenzione del photoageing contenente idrossitirosolo. L'idrossitirosolo è stato estratto dalle acque di processo della molitura delle olive, sfruttando processi a membrana, seguiti da processi di arricchimento successivi, senza l'uso di solventi.

Sono stati effettuati il DPPH test, per verificare l'attività antiossidante del composto estratto, e l'MTT test, per la valutazione della tollerabilità cutanea, prima di procedere allo sviluppo di sistemi di veicolazione, quali i liposomi, in grado di raggiungere diversi strati della pelle ed ottenere, quindi, un rilascio dell'attivo costante ed efficace nel proteggere tutte le strutture epidermiche.

I liposomi sono stati preparati con differenti rapporti idrossitirosolo/lipidi, utilizzando metodiche di preparazione diverse.

Sono state sviluppate, infine, due formulazioni cosmetiche contenenti idrossitirosolo libero e idrossitirosolo veicolato nei liposomi, sulle quali sono stati effettuati i test preliminari d'uso e di tollerabilità *in vivo*, valutando la variazione di parametri cutanei quali eritema, idratazione, colore e sensazioni indesiderabili.

I risultati ottenuti incoraggiano a proseguire gli studi sulla valutazione *in vivo* dell'efficacia dei prodotti sviluppati, sia per un'attività lenitiva dopo un insulto indotto da radiazioni ultraviolette, che come preventivo nel fotoinvecchiamento.

## **Introduzione**

L'invecchiamento della pelle, nell'ultimo decennio, ha affascinato i ricercatori e la prevenzione dell'invecchiamento cutaneo è uno dei più attuali ed interessanti temi di ricerca della moderna cosmetologia. L'invecchiamento cronologico della pelle detto anche invecchiamento intrinseco interessa la pelle così come gli altri organi. A questo processo innato si sovrappone un invecchiamento precoce causato da fattori estrinseci che si manifesta con danni del tessuto connettivo provocati soprattutto dalle radiazioni ultraviolette. E' evidente che in questi processi di invecchiamento estrinseco ed intrinseco, sono coinvolti meccanismi biologici, biochimici e molecolari [1]. Il fotoinvecchiamento è una condizione che denota evidenti e microscopici cambiamenti cutanei indotti da intense e ripetute esposizioni solari [2]. Conosciuto come dermatoeliosi, il fotoinvecchiamento si manifesta come secchezza, desquamazione, indurimento, ingiallimento e approfondimento della tramatura, pigmentazione irregolare. La cute fotoinvecchiata appare cronicamente infiammata e irregolare per la presenza di molte lesioni benigne, premaligne o maligne indotte dalla fotoesposizione.

I radicali liberi, generati in seguito ad esposizione della pelle a radiazioni UVA e UVB e ad agenti inquinanti presenti nell'atmosfera, sono coinvolti in diversi processi fisiologici e ne sono stati evidenziati gli effetti negativi soprattutto quando si trovano in elevate concentrazioni. Le specie reattive dell'ossigeno sono responsabili anche dei cambiamenti che riguardano le proteine strutturali del derma come l'accumulo di elastina e la degradazione del collagene. Giocano, inoltre, un ruolo centrale nel metabolismo del collagene, non solo distruggendo direttamente il collagene interstiziale, ma anche inattivando gli inibitori delle metalloproteasi e inducendo la sintesi e l'attivazione delle stesse.

La pelle possiede un efficiente sistema di difesa, costituito da sostanze ad azione antiossidante in grado di prevenire la produzione di radicali liberi da parte dei siti endogeni e di incrementarne la stabilità fisica nei confronti di danni ossidativi. Il sistema di difesa antiossidante consiste di un network a cui appartengono antiossidanti enzimatici e non enzimatici [3, 4].

Diversi approcci possono essere adottati per aumentare l'efficacia degli antiossidanti e per combattere l'invecchiamento quali l'aumento della concentrazione di antiossidanti a livello intracellulare e plasmatici, la veicolazione di antiossidanti lipofili nelle membrane e nei lipidi, il trasporto extracellulare di molecole antiradicaliche o di antiossidanti e l'utilizzo di molecole con attività scavenging nei confronti del radicale superossido.

E' stata ormai confermata la capacità da parte di sostanze ad azione antiossidante come l' $\alpha$ -tocoferolo, l'acido ascorbico e il  $\beta$ -carotene di inibire danni cutanei quali edema, apoptosi e perossidazione lipidica. Da un punto di vista pratico una adeguata fotoprotezione può proteggere

quotidianamente la pelle. Attualmente nei prodotti cosmetici si ricorre spesso all'utilizzo di antiossidanti e vitamine per migliorare l'aspetto della pelle, per proteggere e possibilmente correggere i danni che derivano dalla produzione di radicali liberi. Negli ultimi trent'anni si è verificato un enorme incremento nell'utilizzo di prodotti di origine naturale [5] come strategia nella prevenzione e nel trattamento dei danni fotoindotti. Le attività biologiche di numerosi estratti vegetali sono state largamente sfruttate in campo cosmetico. Particolare attenzione è stata dedicata alla presenza di antiossidanti naturali, lipofili ed idrofili. Il processo di ossidazione e la formazione di radicali liberi potrebbero essere prevenuti facendo ricorso all'utilizzo di antiossidanti di sintesi, ma l'interesse è rivolto soprattutto agli antiossidanti di origine naturale perchè considerati più sicuri rispetto ai composti di sintesi. Tipici esempi di antiossidanti naturali sono: il tocoferolo, i flavonoidi, l'acido cinnamico, composti peptidici e fenolici. Questi ultimi possono venire estratti dall'*Olea Europaea L.* coltivata per i suoi frutti e per ottenere l'olio di oliva, utilizzato soprattutto in campo alimentare [6].

I tre composti fenolici presenti in concentrazioni elevate nell'olio di oliva sono: il glucoside oleuropeina, l'idrossitirosolo (3,4-diidrossifenil etanolo) e il tirosolo. Questi tre composti sono strutturalmente correlati [7], ma la loro attività comune di antiossidanti non dipende dalla loro somiglianza strutturale, bensì dai loro differenti meccanismi d'azione [8]. L'idrossitirosolo e il tirosolo sono strutturalmente identici fatta eccezione per il fatto che l'idrossitirosolo possiede un gruppo ossidrilico in più in posizione meta. L'oleuropeina, che fa parte di una classe di composti chiamati secoiridoidi, è un estere formato da idrossitirosolo e acido elenolico. L'oleuropeina è il composto fenolico principale presente nel frutto, mentre l'idrossitirosolo è il composto fenolico principale presente nell'olio di oliva. Non appena i frutti maturano, la concentrazione di oleuropeina diminuisce, mentre la concentrazione di idrossitirosolo e dei prodotti di idrolisi dell'oleuropeina aumenta.

Si attribuiscono agli estratti delle foglie di ulivo importanti attività biologiche quali quella antipertensiva, antiossidante, antivirale, antitumorale, dovute alla presenza di sostanze che appartengono ad alcuni gruppi di composti fenolici quali: Oleuropeosidi (oleuropeina e verbascoside); flavoni (luteolin-7-glucoside, apigenin-7-glucoside, diosmetin-7-glucoside, luteolina e diosmetina); flavonoli (rutina); flavan-3-oli (catechina) e fenoli sostituiti (tirosolo, idrossitirosolo, vanillina, acido vanillico, acido caffeico).

Nelle foglie il composto più abbondante risulta essere l'oleuropeina, seguita da idrossitirosolo, dai flavon-7-glucosidi di luteolina e apigenina e dal verbascoside.

L'estrazione dell'oleuropeina, così come quella dei singoli composti fenolici, dalle matrici naturali (frutti, semi, foglie) è complicata dalla sensibilità all'ossidazione e all'idrolisi. I laboratori di

Chimica Organica del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali dell'Università di Lecce, in collaborazione con l'Azienda Farmaceutica Lachifarma s.r.l di Zollino (Le) hanno messo a punto un processo di estrazione dei suddetti composti dai residui di potatura di olivo in modo da riprodurre fedelmente la composizione delle sostanze contenute nelle piante officinali senza indurre trasformazioni a carico dei principi attivi[9]. I polifenoli ottenuti attraverso questo processo possono essere utilizzati per la preparazione di formulazioni farmaceutiche allo scopo di prevenire lo stress ossidativo a livello delle membrane delle cellule del derma mediante azione antinvecchiamento e protettiva nei confronti della pelle; inoltre, sembra che l'idrossitirosolo presenti proprietà depigmentante perché capace di antagonizzare il processo di melanogenesi [10]. E' stata provata l'evidenza degli effetti benefici apportati da tirosolo, idrossitirosolo, e oleuropeina: sono potenti "scavengers" nei confronti dell'anione superossido, e dell'acqua ossigenata e sono in grado di prevenire la formazione di specie reattive dell'ossigeno. I composti fenolici sono prototipi di antiossidanti "chain-breaking"; il loro effetto protettivo nei confronti del danno lipoperossidativo dipende dalla capacità del gruppo ossidrile di donare ioni idrogeno. La loro attività è correlata all'abilità di interagire con le membrane biologiche. L'oleuropeina, essendo una molecola anfipatica, è in grado di attraversare le membrane cellulari a livello di specifici compartimenti allo stesso modo dell'idrossitirosolo. L'idrossitirosolo passa attraverso le membrane cellulari mediante un meccanismo di diffusione passiva e neutralizza gli effetti citotossici dei radicali [11].

### **Scopo del lavoro**

Lo scopo di questo lavoro è lo sviluppo di un prodotto cosmetico sicuro ed efficace nella prevenzione del photoageing contenente idrossitirosolo.

Per prima cosa è stato necessario estrarre l'idrossitirosolo dalle acque di processo della molitura delle olive in modo da ottenere l'attivo in elevata concentrazione e di purezza accettabile.

Sono stati inoltre preparati sistemi liposomiali a base di Fosfatidilcolina e Colesterolo contenenti idrossitirosolo ed i sistemi preparati sono stati caratterizzati per dimensioni, resa di produzione e contenuto di attivo.

Sono state infine preparate formulazioni cosmetiche contenenti Idrossitirosolo libero in diverse concentrazioni e formulazioni contenenti liposomi veicolanti l'attivo. Su queste formulazioni è stato effettuato un primo test di tollerabilità "in vivo" al fine di valutare eventuali reazioni indesiderate dopo applicazione topica.

### **Materiali e Metodi**

#### **Valutazione del potere "radical scavenger" dell'idrossitirosolo**

La valutazione del potere antiradicalico dell'idrossitirosolo è stata effettuata valutando la riduzione di assorbanza a 515nm del radicale stabile 2,2diphenyl-1picrylhydrazyl (DPPH) dopo contatto con soluzioni dell'Attivo a diverse concentrazioni (12).

Per ogni concentrazione di antiossidante è stato effettuato uno studio di cinetica della durata di 40 minuti ed è stata determinata la diminuzione di assorbanza del DPPH. L'esatta concentrazione di radicale libero nel mezzo di reazione è stata calcolata in base ad una curva di calibrazione precedentemente costruita. Tutte le prove sono state eseguite in triplicato.

### **Preparazione di sistemi liposomiali a base di fosfatidilcolina e colesterolo e contenenti idrossitirosolo**

Per preparare i liposomi contenenti idrossitirosolo si è utilizzata la metodica dell'evaporazione in fase inversa o REV seguita da un processo di purificazione mediante centrifugazione.

E' stata utilizzata questa metodica perchè risulta la più adatta a veicolare principi attivi di natura idrofila e permette di ottenere una buona efficienza di incapsulazione. Questa metodologia prevede la preparazione di una emulsione A/O in cui il rapporto volumetrico tra fase acquosa e fase organica è 1 : 6. La fase acquosa è costituita da tampone fosfato 10 mM pH 7,4 o da una soluzione di idrossitirosolo in tampone fosfato 10 mM pH 7,4 in concentrazioni variabili comprese tra 4mg/ml e 8 mg/ml.

La fase organica è costituita da una miscela di etere dietilico e cloroformio (1:1 v/v) in cui vengono sciolti i lipidi (fosfatidilcolina: Colesterolo rapporto molare 1:1). In alcuni lotti l'idrossitirosolo è stato aggiunto direttamente alla fase lipidica.

L'emulsione viene preparata aggiungendo la fase acquosa a quella organica sotto agitazione mediante agitatore a vibrazione Vortex (Velp, Scientifica). L'emulsione viene posta in evaporatore rotante (Rotavapor mod. RV05, IKA,) applicando il vuoto a 40°C, alla velocità di 140 rpm fino alla formazione di un gel che viene successivamente sottoposto a flusso di N<sub>2</sub> costante per 30 minuti in modo da eliminare il solvente residuo. La sospensione liposomiale così ottenuta viene sottoposta a centrifuga a 4 °C, ad una velocità di rotazione pari a 16400 rpm per un'ora utilizzando una Eppendorf model 5417R per eliminare l' Idrossitirosolo non incapsulato ed il sedimento contenente i liposomi appena formati viene liofilizzato in un liofilizzatore Lio-5P (Cinquepascale s.r.l Prezzano s/n, Milano con pompa Edward modello RV8, Crawley, Sussex, England ) per 24 ore ad una temperatura di -51,7 °C e ad una pressione di 0,215 mbar. Il solido così ottenuto è conservato in freezer.

Ogni lotto è stato preparato in triplicato (Tab 1 ).

**Tabella 1**  
Composizione dei liposomi contenenti Idrossitirosolo (HT )

<i>Lotto</i>	<i>Rapporto molare HT : Lipidi</i>
LPH1 -LPH2 -LPH3	0 : 1
LPH4 -LPH5 -LPH6	0,5:1
LPH7 -LPH8 -LPH9	1 : 1
LPH10 -LPH11 -LPH 12	2 : 1
LPH13 –LPH14-LPH15*	0,5 : 1
LPH16-LPH17-LPH18*	1 : 1
LPH19-LPH20 –LPH21*	2 : 1

\*Liposomi contenenti Idrossitirosolo (HT ) aggiunto direttamente alla fase lipidica.  
I lotti LPH1 –LPH2 –LPH 3 rappresentano i lotti bianchi.

Tutti i lotti di liposomi preparati sono stati caratterizzati dal punto di vista dimensionale, per resa del processo produttivo e per contenuto di attivo. Per l'analisi dimensionale dei liposomi si è utilizzato il Malvern Mastersizer 2000. Si tratta di uno strumento in grado di misurare le dimensioni delle particelle mediante il fenomeno della diffrazione della luce laser (*light scattering*) in un intervallo dimensionale da 20 nm a 2mm. Per ogni campione sono state effettuate tre determinazioni e i risultati sono espressi come  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  e  $d_{90}$  che rappresentano rispettivamente le dimensioni particellari in  $\mu\text{m}$  al di sotto delle quali si trova il 10%, il 50% e il 90% del campione.

La valutazione della resa del processo produttivo è stata condotta determinando in modo quantitativo il contenuto dei singoli componenti dei liposomi: fosfatidilcolina, colesterolo e idrossitirosolo mediante analisi HPLC effettuate sul prodotto liofilizzato. Per rendere possibile la determinazione quantitativa dell'idrossitirosolo incapsulato è stato necessario prima rompere le membrane liposomiali in modo da liberare l'attivo e poterlo di seguito analizzare. La lisi dei liposomi è stata ottenuta mettendo a contatto per un'ora a 60 °C una nota quantità di liposomi con una soluzione acquosa al 10% del tensioattivo Triton X-100, seguita da vigorosa agitazione in Vortex (Velp. Scientifica) a 25 Hz per un tempo opportuno. L'effettiva dissoluzione dei liposomi è stata verificata mediante analisi di torbidità con lo spettrofotometro UV-VIS Beckman DU 7500 (Beckman Analytical S.p.A., Milano, Italia) ad una lunghezza d'onda compresa tra i 400 e gli 800 nm. I campioni, così ottenuti, sono stati utilizzati per effettuare la determinazione del contenuto di Idrossitirosolo. Ogni analisi è stata effettuata in triplicato. La determinazione quantitativa dell'idrossitirosolo è stata effettuata applicando una metodica HPLC utilizzando un cromatografo modello HP 1100 Chem Station Hewlett Packard (Waldbroom, Germania) collegato ad un rivelatore UV-VIS. La colonna utilizzata è una ZORBAX HP, SB-phenyl (250 × 4,6 mm d.i.) costituita da particelle da 5  $\mu\text{m}$ . La capacità del loop è di 50  $\mu\text{l}$ , il rivelatore UV impostato a 280

nm. La determinazione è stata condotta in eluizione isocratica, ad un flusso di 0,7 ml/min, con una fase eluente costituita da CH<sub>3</sub>COOH 1%/CH<sub>3</sub>CN in rapporto volumetrico 70:30. Per effettuare l'analisi quantitativa dell'idrossitirosolo è stata costruita una curva di calibrazione utilizzando soluzioni dello stesso in acqua in un intervallo di concentrazioni tra 5 e 100 µg/ml.

L'analisi quantitativa della fosfatidilcolina è stata effettuata mediante analisi HPLC su una quantità nota di prodotto liofilizzato sciolto in CH<sub>3</sub>OH. L'apparecchio utilizzato è un modello HP 1100 Chem Station Packard (Waldbroon, Germania) collegato ad un rivelatore UV-VIS (Hewlett-Packard UV-VIS detectors). La colonna cromatografica è una Zorbax C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub> (300 x 3,9 mm d.i.), impaccata con particelle da 10 µm. Le condizioni di analisi adottate sono state le seguenti: volume di iniezione di 50 µl, rivelatore UV a 204 nm, flusso 1,5 ml/min. La determinazione della fosfatidilcolina è stata effettuata in condizioni isocratiche con una fase eluente costituita da acetonitrile/metanolo/soluzione di ammonio fosfato 0,115 % in rapporto 45/50/5, v:v:v. Il pH della soluzione salina di ammonio fosfato deve essere compreso tra 4,7 e 4,8. La soluzione è stata filtrata con filtri Millipore 0,45 µm e tutti i componenti della fase mobile sono stati sonicati (sonicatore Ultrasonic UTA Falc Instruments S.r.l., Treviglio, Italia) per 20 minuti prima di essere utilizzati per le analisi. E' stata costruita una curva di calibrazione della PC, in un range di concentrazioni compreso tra 100 µg/ml e 2000 µg/ml. Il tempo di ritenzione della PC 3'87".

La determinazione del colesterolo è stata effettuata mediante analisi HPLC utilizzando un modello HP 1100 Chem Station Packard (Waldbroon, Germania) con colonna Zorbax ODS (250 x 4,6 mm d.i, impaccata con particelle da 5 µm) collegato ad un rivelatore UV-VIS. Le analisi sono condotte in condizioni isocratiche con una fase eluente costituita da solo metanolo, con un flusso di 1,6 ml/minuto; rivelatore UV a 207 nm, volume del loop d'iniezione di 50 µl. Anche in questo caso è stata costruita una curva di calibrazione del colesterolo in metanolo, in un range di concentrazioni di 20- 100 µg/ml, che viene riportata in figura 7. Il tempo di ritenzione del colesterolo è 11'40".

### **Valutazione “in vitro” della citotossicità**

Per la valutazione della citossicità, della vitalità e proliferazione cellulare dopo contatto con sostanze esogene, è stato utilizzato il test colorimetrico del MTT (3-[4,5-dimetiltiazolo-2-dl]-2,5-difeniltetrazolo bromuro)[13]. In questo test viene quantificata l'attività mitocondriale, segno di vitalità cellulare, misurando la formazione di cristalli di colore blu-violetto, che vengono a formarsi in seguito alla riduzione dell'anello tetrazolico, presente nella struttura del MTT.

Il test del MTT è stato effettuato su culture di fibroblasti umani sani. In una piastra multipozzetti (96 Well Cell Culture Cluster 3596, Costar) sono state seminate 20000 cellule in ogni pozzetto; lasciate in incubazione a 37°C per circa 2 ore; è stato poi eliminato il siero delle cellule e sono stati seminati 100 µl di campione per pozzetto. Ogni campione è stato seminato in 5 pozzetti, mentre

almeno 5 pozzetti sono stati inoculati con solo medium, come controllo. I campioni erano stati preventivamente diluiti, in modo da ottenere le concentrazioni desiderate, in un opportuno medium (DMEM S/S), tenendo ben presente che la diluizione massima consentita campione-DMEM S/S è di 1:10. La piastra è stata quindi posta in incubazione, sempre a 37°C, per circa 40 ore (incubatore Heraeus, Hera Cell). Sono poi stati seminati 25 µl di MTT in DMEM S/S (concentrazione di 5 mg/ml) in ogni pozzetto. Dopo 2 ore la soluzione di MTT è stata eliminata, facendo attenzione a non toccare le cellule e i cristalli formati sul fondo del pozzetto. Sono quindi stati effettuati 2 lavaggi con PBS, per allontanare gli eventuali residui. In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di DMSO e si è messa la piastra in leggera agitazione, per incentivare la solubilizzazione dei cristalli. Sono infine state effettuate delle letture allo spettrofotometro (Microplate Manager, Bio – Rad Laboratories Inc.), alla lunghezza d'onda di 595 nm, con riferimento a 655 nm. Le analisi sono state condotte su soluzioni di idrossitiroso a diversa concentrazione (0,2%;0,5%;1%;2%), formulazioni placebo e su liposomi placebo e i risultati, sono espressi in termini di vitalità cellulare percentuale rispetto ai pozzetti controllo, considerati 100% .

#### **Valutazione “in vivo” della tollerabilità di formulazioni cosmetiche**

E' stato effettuato il “Controlled application test” al fine di valutare la tollerabilità e le eventuali proprietà idratanti e illuminanti di formulazioni contenenti idrossitiroso libero e veicolato in liposomi[14].

#### **POPOLAZIONE IN STUDIO**

Sono stati scelti volontari sani e di sesso femminile.

#### Criteri generali di inclusione

- individui sani di sesso femminile;
- età compresa tra 20 e 40 anni;
- tutti i volontari coinvolti nello studio presentavano disponibilità alla partecipazione nello stesso mediante firma di un consenso informato.

#### Criteri generali di non inclusione

- individui che presentassero nell'area cutanea di indagine segni che potessero interferire con i risultati del saggio;
- ipersensibilità o intolleranza conosciute a prodotti cosmetici e/o di detersione corporea, inclusi prodotti per la protezione solare;
- sensibilità all'esposizione solare;
- individui che hanno effettuato da meno di un mese terapie con medicinali fotosensibili;
- individui che hanno effettuato da meno di un mese terapie con vitamina A o derivati;



- individui che hanno effettuato trattamenti con radiazioni UVA e/o UVB da meno di un mese.

## PIANO DI STUDIO

### Formulazioni applicate:

Placebo: isopropilmiristato 10%, sepigel 305 (poliacrilamide/C13-C14 isoparaffina/ Laureth7) 3%, sepicide HB (fenossietanolo, miscela di parabeni) 0,2%, acqua q.b. a 100%.

HT1, HT2, HT3, formulazioni contenenti idrossitirosolo libero in concentrazioni rispettivamente di 0,4%, 1% e 2%

LP: formulazione contenente il 15% di liposomi placebo

LPHT1: formulazione contenenti il 15% di liposomi carichi di Idrossitirolo (concentrazione finale di idrossitirosolo nel formulato pari a 0,4%) Dose applicata: 20 mg 1 volta al giorno mediante una siringa preriempita.

Sito di applicazione: regione volare dell'avambraccio in siti randomizzati

Durata del trattamento 3 settimane con valutazioni settimanali. Tutte le misurazioni sono state effettuate in condizioni ambientali controllate di temperatura ( $21^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ ) e umidità (40%-60%).

Valutazione Biometrica: Idratazione cutanea, Contenuto di melanina, Contenuto di sebo e indice di eritema (Cutometer MPA 580, CK electronic GmbH, Germany)

## **Risultati e discussione**

### **Valutazione del potere “radical scavenger” dell'idrossitirosolo**

Dagli studi di cinetica della reazione Idrossitirosolo/DPPH è stato possibile determinare lo steady state della reazione, pari a 30 minuti. E' stato inoltre possibile determinare la percentuale di DPPH rimasto allo steady state e plottare questi dati in un altro grafico in funzione del rapporto molare Idrossitirosolo/DPPH. In questo modo è stata definita l'attività antiradicalica dell'idrossitirosolo come la quantità di antiossidante necessaria per ridurre al 50% la concentrazione di DPPH ( $EC_{50} = 0,152 \text{ HT/DPPH}$ ) e il potere antiradicalico dell'idrossitirosolo espresso come  $1/EC_{50}$  ( $ARP = 6,58$ ), indicando come l'idrossitirosolo si comporti come un efficiente antiossidante ad azione antiradicalica.

### **Preparazione e caratterizzazione di sistemi liposomiali a base di fosfatidilcolina e colesterolo e contenenti idrossitirosolo**

I liposomi preparati mediante la metodica REV appaiono di forma tondeggiate abbastanza regolare e multilamellari. La variazione dei parametri studiati (rapporto molare, composizione fase idrofila, solubilizzazione dell'Attivo nelle fasi idrofila/liofila) non ha influenzato le caratteristiche organolettiche di tutti i liposomi prodotti.

La distribuzione dimensionale dei liposomi prodotti risulta omogenea per tutti i lotti prodotti con dimensioni idonee all'uso topico ( $d_{10} < 3,104 \mu\text{m}$ ,  $d_{50} < 6,282 \mu\text{m}$  e  $d_{90} < 12,431 \mu\text{m}$ ).

La resa di produzione, espressa come rapporto percentuale tra la quantità di fosfatidilcolina, colesterolo e idrossitirosolo effettivamente presenti nel prodotto liofilizzato rispetto alle quantità utilizzate durante la preparazione dei liposomi, è stata tra il 25 ed il 62% (Tabella 2). Il valore più alto è stato ottenuto per i lotti prodotti con il rapporto HT/Lipidi 1:1 incorporando l'Idrossitirosolo nella membrana lipidica (lotti LPH16-18). La resa percentuale dei lipidi, calcolata come rapporto percentuale tra le  $\mu\text{moli}$  di lipidi ritrovate nei liposomi e le  $\mu\text{moli}$  teoriche degli stessi utilizzate nel processo produttivo, è risultata sempre soddisfacente ed il valore più elevato è stato riscontrato nei liposomi LPH16-18.

La capacità di caricamento dei liposomi è compresa tra i 10 e i 39  $\mu\text{g}$  HT/mg lipidi. Anche in questo caso il posizionamento dell'attivo sembra essere un fattore importante anche se il valore ottimale è stato riscontrato nei liposomi in cui l'idrossitirosolo è stato inglobato nel compartimento acquoso (LPH7-9).

**Tabella 2**

Resa % del processo produttivo, resa % dei lipidi e contenuto di attivo dei liposomi contenenti HT

<i>Lotto</i>	<i>Rapporto molare HT: lipidi</i>	<i>Resa Processo (% <math>\pm</math> d.s.)</i>	<i>Resa Lipidi (% <math>\pm</math> d.s.)</i>	<i>Contenuto (<math>\mu\text{g}</math> HT/mg lipidi <math>\pm</math> d.s.)</i>
LPH1-LPH3	0 : 1	51,96 $\pm$ 24,35	53,30 $\pm$ 23,31	-
LPH4- LPH6	0,5 : 1	33,35 $\pm$ 11,6	36,19 $\pm$ 13,70	10,89 $\pm$ 1,20
LPH7-LPH9	1 : 1	25,76 $\pm$ 4,77	30,63 $\pm$ 6,48	39,50 $\pm$ 8,56
LPH10- LPH12	2 : 1	32,17 $\pm$ 1,14	44,50 $\pm$ 2,42	37,38 $\pm$ 8,16
LPH13- LPH15	0,5 : 1*	40,64 $\pm$ 5,82	56,27 $\pm$ 18,80	4,41 $\pm$ 0,85
LPH16- LPH18	1 : 1 *	61,93 $\pm$ 18,38	72,61 $\pm$ 17,26	12,65 $\pm$ 6,50
LPH19-LPH21	2 : 1 *	28,94 $\pm$ 10,93	39,96 $\pm$ 14,05	30,05 $\pm$ 5,90
LPH22- LPH24	1 : 1**	43,13 $\pm$ 17,45	46,51 $\pm$ 17,45	18,06 $\pm$ 4,75

\*: lotti preparati aggiungendo l'HT direttamente alla fase lipidica

\*\* : lotti preparati solubilizzando l'HT metà alla fase lipidica e metà alla fase idrofila

### Valutazione “in vitro” della citotossicità

I risultati di tossicità cellulare effettuati sulla formulazione placebo mediante il test del MTT a diverse diluizioni evidenziano che l'emulgel non sembra essere tossico per le cellule, avendo ottenuto infatti valori di vitalità percentuale compresi tra il 90 ed 101% .

Sono stati inoltre testati i liposomi placebo in diverse concentrazioni di lipidi. Nell'effettuare il test è stato riscontrato che i liposomi interferiscono, probabilmente fisicamente, nella lettura spettrofotometrica. L'interferenza non è risultata proporzionale alle concentrazioni utilizzate e, tramite il microscopio ottico, è stato possibile evidenziare una precipitazione e aggregazione lipidica incompatibile con la vitalità cellulare, a prescindere dai valori di assorbanza ottenuti. Per questo motivo, il test tal quale non può essere applicato ai sistemi liposomiali e si stanno cercando metodi alternativi. Allo stesso modo è risultato evidente che l'idrossitirosolo si lega specificatamente alla molecola di MTT portando a valori di assorbanza più elevati rispetto al controllo. Pertanto, anche in questo caso, il test non può essere applicato.

### Valutazione “in vivo” della tollerabilità di formulazioni cosmetiche

La Tabella 3 riporta i risultati relativi alla valutazione dell'eritema dopo applicazione delle formulazioni contenenti idrossitirosolo libero alle diverse concentrazioni testate. I risultati evidenziano come le formulazioni siano state ben tollerate per tutta la durata dell'esperimento.

**Tabella 3.**

Risultati relativi alla valutazione dell'eritema espressi come media± d.s. In parentesi viene riportata la variazione % rispetto a t<sub>0</sub>

Formulazioni		t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>
<b>Placebo</b>	media ± d.s. % vs t <sub>0</sub>	228,12±38,22	214,12±27,94 (-6,14%)	242,54±29,46 (+6,32%)	215,83±32,64 (-5,39%)
<b>HT1</b>	media ± d.s. % vs t <sub>0</sub>	234,79±44,19	257,75±69,16 (9,78%)	246,50±32,35 (+4,99%)	243,71±73,08 (+3,8%)
<b>HT2</b>	media ± d.s. % vs t <sub>0</sub>	238,33±44,03	254,75±67,22 (+6,89%)	242,37±28,91 (+1,69%)	236,04±55,51 (-0,96%)
<b>HT3</b>	media ± d.s. % vs t <sub>0</sub>	234,37±52,72	240,25±65,52 (+2,51%)	250,67±36,67 (+6,95%)	214,71±44,25 (-8,39%)

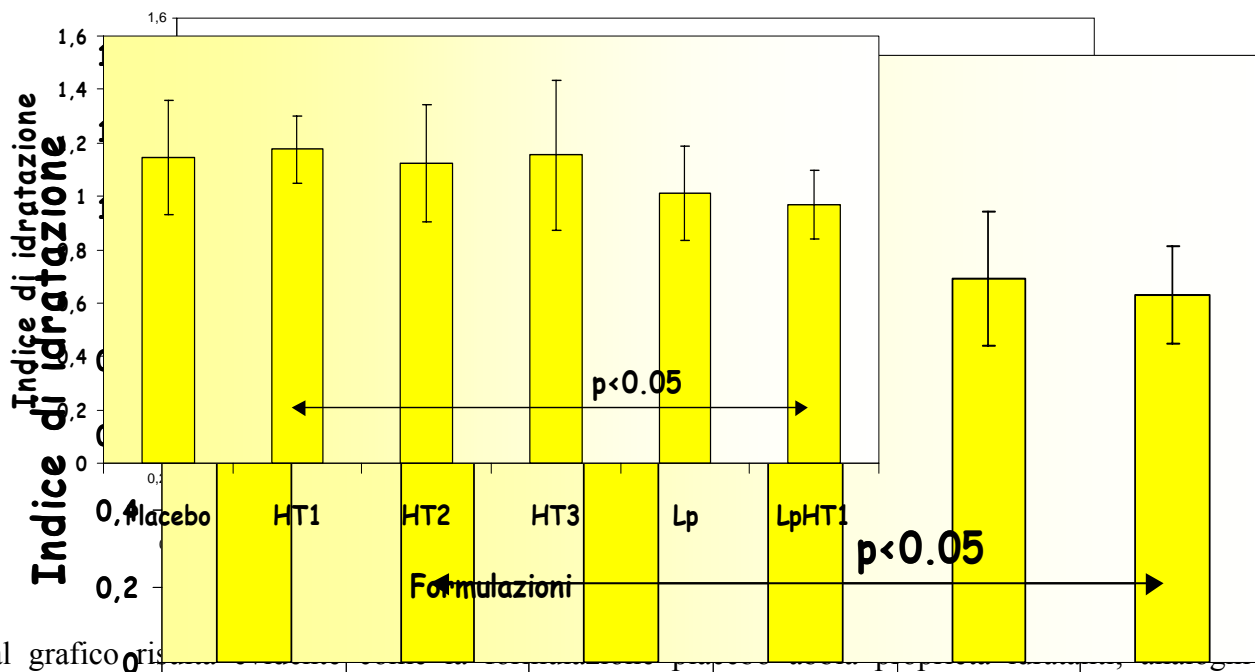
**Tabella 4.**

Risultati relativi alla valutazione del contenuto di melanina espressi come media ± d.s. In parentesi viene riportata la variazione % rispetto a t<sub>0</sub>.

Formulazioni		t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>
<b>Placebo</b>	media ± d.s. % vs t <sub>0</sub>	178,67±46,16	183,54±54,31 (+2,73%)	170,96±44,96 (-4,31%)	174,58±50,07 (-2,29%)
<b>HT1</b>	media ± d.s. % vs t <sub>0</sub>	206,46±48,73	210,79±54,57 (+2,01%)	199,54±49,24 (-3,35%)	199,04±55,20 (-3,59%)
<b>HT2</b>	media ± d.s. % vs t <sub>0</sub>	192,46±56,86	205,71±65,16 (+6,88%)	193,13±50,34 (+0,35%)	200,17±65,57 (+4,00%)
<b>HT3</b>	media ± d.s. % vs t <sub>0</sub>	187,17±48,26	182,08±48,01 (-2,72%)	171,58±45,68 (-8,32%)	178,67±41,60 (-4,54%)

I risultati non evidenziano una riduzione statisticamente significativa del contenuto di melanina dopo applicazione delle formulazioni contenenti idrossitirosolo libero, pur evidenziando una tendenza alla riduzione nel tempo.

In figura 1 è riportato l'andamento dell'indice di idratazione di tutte le formulazioni considerate in questo studio.



Dal grafico ris

risultati si evidenziano per le formulazioni contenenti idrossitirosolo libero. La valutazione dell'idratazione effettuata dopo applicazione delle formulazioni contenenti i liposomi evidenziano una riduzione statisticamente significativa dell'indice di idratazione. Questo risultato può essere spiegato dalla differenza di meccanismo di idratazione dei sistemi liposomiali, difficilmente evidenziabili con la corneometria.

## Conclusioni

I risultati ottenuti in questo studio preliminare consentono di concludere che:

- l'idrossitirosolo può essere estratto dalle acque di vegetazione ottenute dalla molitura delle olive in concentrazioni molto elevate mantenendone il potere antiradicalico;
- la metodica REV utilizzata ha permesso di ottenere liposomi veicolanti idrossitirosolo capaci di mantenerne l'attività antiradicalica; la resa di produzione e il contenuto di attivo sono state variabili a seconda della distribuzione della molecola all'interno delle vescicole;
- il preliminare studio effettuato "in vivo" ha permesso di evidenziare la buona tollerabilità delle formulazioni testate

## Bibliografia

[1] W. Ma, M. Wlaschek, I. Tantcheva-Poòr, L. A. Schneider, L. Naderi, Z. Razi-Wolf, J. Schüller e K. Scharffetter-Kochanek, Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue, *Clinical and experimental dermatology*, 26, (2001), 592-599.

- [2] Yoshiki Miyachi, Photoaging from an oxidative standpoint, *Journal of Dermatological Science*, 9, (1995), 79-86.
- [3] Ron Kohen, Irith Gati, Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress, *Toxicology*, 148, (2000 ), 149-157.
- [4] S. Briganti , M. Picardo, Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new, *European Academy of Dermatology and Venereology*, 17, (2003), 663-669.
- [5] Larry E. Millikan, Cosmetology, cosmetics, cosmeceuticals: definitions and regulations, *Clinics in Dermatology*, 19, (2001), 371-374.
- [6] B. Amrò, T. Aburjai, S. Al-Khalil, Antioxidative and radical scavenging effects of olive cake extract, *Fitoterapia* 73, (2002), 456-461.
- [7] Kellie L. Tuck, Peter J. Hayball, Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects, *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, (2002 ), 636-644.
- [8] O. Benavente-García, J. Castillo, J. Lorente, A. Ortuño, J. A. Del Rio, Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves, *Food Chemistry* 68, (2000 ), 457-462.
- [9] L. Villanova, L. Villanova, G. Fastello, A. Merendino, Process for the recovery of tyrosol and hydroxytyrosol from oil mill wastewaters and catalytic oxidation method in order to convert tyrosol in hydroxytyrosol, Pat. No. EP1623960A1, 2006
- [10] C. Yoshihiro, A. Hiroshi, Y. Akira, K. Seika, Y. Kazuhiko, D. Kazue, Hydroxytyrosol, application for skin external medicine or bathing agent, Pat. No. JP8119825, 1996.
- [11] Stefania D'Angelo, Diego Ingresso, Valentina Migliardi, Alvara Sorrentino, Giovanna Donnarumma, Adone Baroni, Lucia Masella, Maria Antonietta Tufano, Marcello Zappia, Patrizia Galletti, Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long -wave ultraviolet radiation in melanoma cells, *Free Radical Biology and Medicine* 38, (2005), 908-919.
- [12] V. Bondet, W. Brand-Williams and C. Berset, Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH· Free Radical Method, *Food Science and Technology*, 30, (1997), 609-615.
- [13]K.-S. Vellonen, P. Honkakoski, A. Urtti – “Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity” – *European Journal of Pharmaceutical Science* 23 (2004), 181-188.
- [14]K. Schrader, A. Domsch, *Cosmetology- Theory and Practice* volume I, K. Schrader, A. Domsch eds (2005) 195-1115.

